

## STRESZCZENIE

Witamina B<sub>1</sub> jest prekursorem difosforanu tiaminy (TDP) – nieodzownego dla każdej żywej komórki kofaktora enzymów, zaangażowanych w najważniejsze szlaki metaboliczne. Głównym obiektem badawczym w niniejszej pracy była syntaza monofosforanu tiaminy z drożdży *Saccharomyces cerevisiae* (THI6) – enzym odpowiedzialny za kluczowy etap biosyntezy tiaminy, tj. połączenie oddzielnie syntetyzowanych komponent tiazolowej i pirymidynowej. Celem pracy była charakterystyka właściwości fizyko–chemicznych rekombinowanego białka THI6, a także zbadanie jego aktywności *in vivo* w różnych warunkach hodowli i w obecności różnych czynników wywołujących stres komórkowy.

Białko THI6 wykazuje podwójną aktywność enzymatyczną – syntazy monofosforanu tiaminy w domenie N–końcowej i kinazy tiazolu w domenie C–końcowej. Do tej pory nie udało się uzyskać struktury krystalicznej tego białka ani poznać dokładnego mechanizmu katalizowanych przez nie reakcji w modelowym organizmie *S. cerevisiae*. Celem niniejszej pracy badawczej było więc uzyskanie informacji o strukturze III–rzędowej białka THI6 i budowie centrum aktywnego w obu domenach oraz poznanie kinetyki katalizowanych reakcji z uwzględnieniem różnych typów inhibicji.

Badania przeprowadzone na białku rekombinowanym nadprodukowanym w komórkach *Escherichia coli* pozwoliły wyznaczyć masę cząsteczkową białka i ustalić, iż jest ono homoheksamerem, a nie oktamerem jak donosiły wcześniejsze publikacje. Pomiar aktywności enzymatycznej obu domen doprowadziły do wyznaczenia podstawowych parametrów kinetycznych takich jak  $K_m$  i  $V_{max}$ , oraz wykazały interesujące zjawisko inhibicji substratowej w domenie syntazowej. Przy użyciu technik modelowania molekularnego opracowano modele obu domen katalitycznych i wytypowano reszty znajdujące się w centrum aktywnym. Metodą ukierunkowanej mutagenyzy zweryfikowano występowanie wybranych reszt aminokwasowych centrów aktywnych w obu domenach białka THI6, w szczególności wskazując na kluczową rolę Ser<sup>114</sup> dla aktywności domeny syntazowej.

Drugi nurt badawczy polegał na analizach *in vivo* wpływu stresu komórkowego na poziom biosyntezy tiaminy w *S. cerevisiae*, których przesłankami były coraz liczniej opisywane w literaturze przykłady związku witaminy B<sub>1</sub> z reakcją roślin i organizmów prokariotycznych na stres. Badania nad reakcją drożdży na stres objęły, oprócz syntazy monofosforanu tiaminy, pirofosfokinazę tiaminy (odpowiedzialną za aktywację tiaminy do TDP; jedyny enzym szlaku biosyntezy o potwierdzonej konstytutywnej ekspresji) oraz transketolazę (wybrany enzym zależny od TDP).

Badania syntazy monofosforanu tiaminy wykazały jej aktywność zarówno w pożywce pozbawionej tiaminy, jak i w pożywce bogatej w tiaminę. A zatem ekspresja tego enzymu, wbrew wcześniejszym doniesieniom literaturowym, nie ulega pełnej represji pod wpływem tiaminy zawartej w pożywce. Aktywności wszystkich wymienionych wyżej enzymów badano w różnych warunkach stresu komórkowego. Wybrano cztery czynniki stresowe: 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (stres oksydacyjny), 42°C (stres termiczny), 1 M NaCl (stres solny) oraz 1 M sorbitol (stres osmotyczny), które testowano w obu typach pożywek (z tiaminą lub bez niej). Wzrost aktywności dysmutazy ponadtlenkowej wykazał, iż wszystkie te warunki generowały w drożdżach stan stresu oksydacyjnego. Zastosowane warunki stresu komórkowego indukowały generalnie wzrost aktywności syntazy monofosforanu tiaminy, a także dobrze skorelowane wzrosty aktywności pirofosfokinazy tiaminy i transketolazy. W badaniach wykorzystano także linie komórkowe z upośledzoną biosyntezą tiaminy (*thi4Δ*, *thi6Δ*), a także szczepy z upośledzoną obroną przed niekorzystnymi warunkami środowiskowymi (*yap1Δ*, *hog1Δ*), które wykazały znaczne zróżnicowanie poziomu aktywności syntazy monofosforanu tiaminy względem szczepu niezmutowanego już w warunkach kontrolnych, a w warunkach stresu komórkowego różnice te jeszcze się pogłębiły, wskazując na zróżnicowaną odpowiedź komórkową w zależności od zastosowanego czynnika stresowego.

Wyniki prezentowane w niniejszej pracy jednoznacznie wskazują, iż biosynteza tiaminy w komórkach drożdży jest ściśle powiązana z warunkami środowiskowymi, zwłaszcza w obecności czynników stresowych takich jak nadtlenek wodoru czy sorbitol. Dzięki jednoczesnej analizie: głównego enzymu biosyntezy tiaminy, enzymu aktywującego tiaminę do TDP oraz zależnego od TDP enzymu zaangażowanego w szlak pentozofosforanowy, nakreślono obraz biosyntezy tiaminy w warunkach stresu, a także postawiono hipotezę odnośnie roli tiaminy w odporności na stres komórkowy w modelowym organizmie *S. cerevisiae*.